



鳥類特異的な翼の指の本数決定機構の解析

著者	野村 直生
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15940号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58732

博士論文（要約）

鳥類特異的な翼の指の本数決定機構の解析

平成 25 年度

東北大学大学院生命科学研究科

生命機能科学専攻

野村 直生

I. 序論

ニワトリ胚は脊椎動物の発生生物学の研究のモデルとして、半世紀以上前から現在まで数多くの研究で用いられてきた。脊椎動物の基本的な構造やそれを形づくる発生の過程というものは、脊椎動物間でよく保存されている。ニワトリの胚は、受精卵の殻の一部を割って窓をあけるだけで観察できる。また、窓をセロハンテープ等で塞いで再び孵卵すれば、1 度窓を開けても発生を継続させることができる。このため、発生中の胚にオペレーションを行い、その後の結果を観察することも可能である。さらに数多くの脊椎動物の胚の中で、ニワトリ胚は比較的大きい。このような観察と実験操作の容易さや、受精卵が大量に入手可能なことなどが、ニワトリ胚が古くから研究に用いられてきた理由である。そして本研究で用いる四肢の発生についても、ニワトリ胚を用いた研究が数多く貢献してきた。

ニワトリを含む脊椎動物の四肢とその原基である肢芽は、親指側から小指側にかけての前後軸、手/足の甲から手/足の平にかけての背腹軸、そして付け根から指先にかけての基部先端部軸としてとらえることができる三次元構造である。肢芽は上皮組織によって包まれた間充織細胞群からなる構造である。この肢芽が発生過程で徐々に伸長していくうちに、間充織は主に軟骨組織(後に骨化して骨格となる)と繊維性結合組織に分化する。そして、それぞれの軸に沿って異なる構造がつくられ、より複雑な肢の形をつくる。四肢の構造は、基部側から柱脚部、軛脚部、自脚部に分けられ、柱脚部には 1 本の骨、軛脚部には前後軸に沿って 2 本骨がそれぞれ存在する。自脚部は主に手/足首より先端部側の構造である。手/足首の骨、指とその指骨の数は種によって様々であるために、自脚部の骨の数は種によって多様性がみられる。しかし一部の無尾両生類を除いて、現存する四足動物で 6 本以上の指をもつ種は存在しない。それぞれの指は 1-5 の番号で定義され、ヒトの場合、親指から小指の番号を 1-5 とする。ニワトリは前肢(翼)に 3 本(番号については後述)、後肢に 4 本(第 1, 2, 3, 4 指)の指をもっている。本研究の目的は、多様な形態をもつ自脚部の中で、「鳥類の前肢はどのような発生メカニズムを用いて 3 本の指を形成するのか」という問題を解明することである。

四肢の発生について、重要な構造の 1 つは AER (Apical Ectodermal Ridge) である。AER は肢芽先端部の背腹軸境界に存在する上皮の肥厚構造である。AER は肢芽の伸長・形態形成に必須な構造であることが知られている。また、AER は間充織細胞の生存にも必要なことが明らかとなっている。この AER では複数の種類の *Fgf* 遺伝子が発現し、FGF タンパ

ク質が間充細胞に向けて分泌されている。そして AER の機能は、これらの FGF タンパク質が担っていると考えられている。AER で発現する複数の *Fgf* 遺伝子の中でも *Fgf8* は AER 全体で発現しており、AER を識別する際のマーカー遺伝子として最もよく用いられる遺伝子である。この他の AER に関する知見として、AER を前側から部分的に除去していくと、除去した AER の大きさに応じて前側の指を含めた四肢構造が欠失していくこと、AER の維持に必要な *Sp9* の発現を抑制した場合は AER の前側が欠失し前側の四肢構造が欠失していくこと、逆にこの遺伝子と同じファミリー遺伝子である *Sp8* を広範囲に発現させると AER が前側に伸長し、前側に過剰指が形成されることなどが報告されている。このため、AER は指の本数決定にも重要な役割を果たしている可能性があると考えられている。これらの AER の知見の全てに、ニワトリの四肢を用いた研究が貢献している。さらに AER の研究の他にも、ニワトリの肢芽は多くの四肢形成の研究に用いられてきた。

しかし鳥類の四肢は、筋肉や腱の配向・骨の数や形、皮膚の構造などの点で、他の四足動物と比較して非常に特殊化された特徴を持ち合わせている。それゆえにニワトリ胚は、鳥類固有の四肢発生のメカニズムを探る上でも用いられてきた。鳥類前肢の指の本数決定機構に迫る本研究も、鳥類固有の四肢発生のメカニズムを解明する研究である。

鳥類の前肢の指の本数決定の発生メカニズムを解明するに際し、古生物学的知見を参考にすることができる。鳥類の祖先とされる獣脚類恐竜は、前肢に 5 本の指をもっていたことが明らかとなっている。これは、鳥類が進化の過程で前肢の 5 本の指のうち、2 本の指を失って指の本数を 3 本にしたことを示している。したがって、鳥類の前肢の指の本数を 3 本に規定する発生イベントを探る際にも、5 本の指のうち失った 2 本の指がどのようにして形成されないようにしているのか、という発生生物学的アプローチから解明していくことが妥当であると考えられる。

鳥類の指の本数決定に関わっていると考えられている発生イベントの中で、最もよく知られているのは ANZ (Anterior Necrotic Zone) と PNZ (Posterior Necrotic Zone) という細胞死領域である。ANZ は肢芽の前側、PNZ は肢芽の後側に存在する。鳥類の肢芽では、この ANZ と PNZ が他の四足動物の肢芽よりも非常に早い時期から存在する。また、多指となるニワトリの変異体ではこれらの細胞死領域が見られず、指の本数が減少する変異体では ANZ での過剰な細胞死が起こる。これらのことから、ANZ と PNZ は細胞死によって指の本数を減少させることで、鳥類の四肢の指の本数に関わっていると考えられている。

しかし鳥類前肢の指の本数決定機構に関して、発生生物学的に調査した論文はほとんど

存在しない。それはいくつかの理由から、鳥類の前肢の指がどの指を欠失して 3 本の指を形成しているのかがわからなかったためである。具体的には、第 1, 5 指を欠失して第 2, 3, 4 指を形成しているという主張と、第 4, 5 指を欠失して第 1, 2, 3 指を形成しているという主張が存在し、どちらが正しいのかが明らかとなっていなかった。それぞれの主張には、いくつか根拠が存在する。鳥類の前肢の指を第 2, 3, 4 指であると主張する主な根拠は、発生途中に形成される 3 本の指の前側と後側に 1 つずつ小さな軟骨隕が形成される、あるいは軟骨形成に必要な遺伝子が発現することである。この軟骨隕や遺伝子発現が、それぞれ第 1 指、第 5 指の痕跡であるとされている。一方 3 本の指を第 1, 2, 3 指であると主張する根拠の 1 つは、発生中の第 1 指に発現する遺伝子の発現パターンである。通常、マウスは第 1 指を含む 5 本の指を前肢・後肢にもち、現存する四足動物で最も鳥類に近縁であるとされるワニは前肢に第 1, 2, 3, 4, 5 指の 5 本の指、後肢に第 1, 2, 3, 4 指の 4 本指をもつ。またニワトリは、後肢に第 1, 2, 3, 4 指の 4 本の指をもつ。つまりこれらの肢は、全て第 1 指を形成する。発生過程では *Hoxd11/12/13* 遺伝子が肢芽で発現することが知られており、これらの肢の第 1 指を形成する領域では *Hoxd13* のみが発現し、第 2 指より後側の指では *Hoxd11/12/13* の 3 つの遺伝子が発現する。ニワトリの前肢芽では、最前指を形成する領域では *Hoxd13* のみが発現し、残り 2 本の後側の指を形成する領域では *Hoxd11/12/13* が発現する。つまりニワトリ前肢芽の最前指を形成する領域と、それより後側の 2 本の指を形成する領域の *Hoxd11/12/13* の遺伝子発現パターンは、マウスやワニの肢芽、ニワトリの後肢芽の第 1 指を形成する領域と、それより後側の指を形成する領域と同じ発現パターンである。そのため、*Hoxd11/12/13* の遺伝子発現パターンを観察すると、ニワトリの前肢の 3 本は第 1, 2, 3 指ということになる。この他、*Mario*, *Sef*, *Mkp3*, *Tsukushi* という遺伝子は、ニワトリ後肢芽の第 1 指と前肢芽の最前指領域で発現することが知られており、この結果も前肢の指が第 1, 2, 3 指であることを支持する。これらの遺伝子発現の結果が、鳥類前肢の 3 本の指は第 1, 2, 3 指であるという主張の根拠である。さらに、鳥類に最も近縁であるとされる前肢に 3 本の指をもつ獣脚類恐竜や、最古の鳥類であるとされる始祖鳥の前肢の 3 本の指の骨格を調べた知見が存在する。その知見を基にすると、3 本の指はこれらのほぼ全ての種において、形態的に第 1, 2, 3 指である。現存する鳥類は、これらの種と非常に近縁であったことから、この知見も鳥類前肢の 3 本の指が第 1, 2, 3 指であることを支持する大きな根拠となっている。

これらの知見から、鳥類は発生過程でどの指を欠失し、どの指を形成することによって

3本の指を形成しているのか、という視点から、鳥類前肢の指の本数決定機構に迫るのは非常に困難である。そこで私が着目したのは「初期の肢芽」である。ほぼ全ての四足動物、特に羊膜類の肢芽は、始め体幹部の側方から半月状に肥厚する形で出現し、この半月状の肢芽が伸長して四肢が形成されていく。ニワトリの肢芽も例外ではなく、肢芽が形成され始めてから比較的早い発生段階、特に **Stage 20** のニワトリ胚の前肢芽と後肢芽は非常に良く似た形・大きさをしている。それにも関わらず、最終的に形成されてくる指の本数は3本、4本と異なる。このことから私は、鳥類の前肢の指の本数決定機構を解明するためには、同じ形・大きさをした前肢芽・後肢芽のどの部分の細胞が、どのような四肢形成への寄与の違いによって指の本数の違いを生み出しているのか、ということを解明することが、前肢芽の指の本数決定機構を解明するためにまず必要であると考えた。

そのために私は、**Stage 20** の前肢芽・後肢芽の辺縁部の間充織細胞のどの部分が、指の本数が決定される時期の肢芽のどの領域に寄与するのかをまとめた予定運命図を作成し、前肢芽と後肢芽の予定運命図を比較・解析した。さらに私は、この予定運命図作成から得られた前肢芽・後肢芽間の予定運命の違いを基に、異なる指の本数を生み出す発生イベントの違いを探索した。本研究では、これらの探索によって得られた結果から、鳥類前肢の指の本数を決定している発生メカニズムについて考察したい。

II. 結果

1. 前肢芽と後肢芽の前側の予定運命の大きな違い

まずは同じ半月状の形をした Stage 20 の前肢芽と後肢芽が、発生過程のどの部分の違いによって最終的に 3 本、4 本という異なる指の本数を生み出すのかという点に着目し、解明を試みた。そのために、Stage 20 の前肢芽・後肢芽を相対的に同じものとして、肢芽の前後軸の辺縁部に沿った間充織細胞が、それぞれどのような予定運命をたどるのかを示す予定運命図を作成した。前肢芽・後肢芽ともに様々なポイントの間充織細胞群を標識したところ、標識された細胞群は、指の本数が決定されている Stage 30 の時点で、数か所の区画に分かれて寄与することが明らかとなった。これらの前肢芽と後肢芽の予定運命図作成の結果より、大きく分けて 4 つのことが明らかとなった。

1 つ目は、前肢芽の 3 本の指は、後肢芽の第 2, 3, 4 指を形成する領域と相対的に同じ位置から形成されてくるということである。

2 つ目は、後肢芽の方が、指が形成される領域が前側に大きいということである。後肢芽には、前肢芽と相対的に同じ位置から形成される 3 本の指に加えて、第 1 指を形成する領域が前側に存在するために、指形成領域が大きくなる。

3 つ目は、指形成領域より基部側に寄与する指形成領域よりも前側の領域が、前肢芽の方が後肢芽よりも後側に存在しているということである。前肢芽も後肢芽も、軀脚部の前側間充織に寄与する部分は柱脚部の前側間充織に寄与する部分よりも後側に存在する。また、これらの指よりも基部側に寄与する領域は、指形成領域よりも前側に存在する。前肢芽の柱脚部の前側間充織に寄与する部分は、後肢芽の軀脚部の前側間充織に寄与する部分よりもさらに相対的に後側に存在した。

4 つ目は、前肢芽の基部側に寄与する領域より前側部分の領域が、ほとんど前肢形成に寄与しないということである。この領域を標識した細胞群は、前肢芽より基部側に存在するか、わずかに前肢芽の基部側に寄与するだけであった。

これらの予定運命図作成の結果より、前肢芽と後肢芽との間では、肢芽の前側部分の領域の予定運命が大きく異なることが示された。前肢芽では基部側を形成する領域より前側の部分が四肢形成にほとんど寄与せず、その分指形成領域よりも基部側を形成する領域が後肢芽よりも大きく後側にずれ、指形成領域が小さくなっている。指は四肢の構造の中で最後に形成されることから、私は、前肢芽と後肢芽の指の本数の違いは、前肢芽・後肢芽

の前側の予定運命の寄与の違いによって生じているのではないかと考えた。このために私は、この肢芽前側の予定運命の違いを生み出す発生イベントを探すことにした。

2. 前肢芽と後肢芽の前側の細胞死が起こり始める時期の違い

鳥類の指の本数に関わっていると考えられているものの1つとして、ANZ とよばれる細胞死領域が挙げられる。ANZ での細胞死は、鳥類の肢芽でのみ非常に早い時期から見られることが明らかとなっている。そこで私は、ニワトリの前肢芽と後肢芽の間でも細胞死の起こり始める時期に違いが存在するのかどうかを調べた。細胞死の検出には *Whole mount in situ* TUNEL 法(以下 TUNEL 法と表記)と Nile Blue 染色法(以下 Nile Blue 法と表記)の2種類の方法を用いた。TUNEL 法は死細胞の断片化された DNA を検出する方法であり、Nile Blue 法は死細胞を食作用によって取り込む細胞を検出する方法である。

まずは TUNEL 法を用いた結果を説明する。TUNEL 法を用いた検出では、前肢芽の ANZ での細胞死は Stage 18 から見られた。前肢芽の ANZ での細胞死は肢芽前端部から後側・先端部側に向かって広がっており、この傾向は Stage 24 まで見られた。しかし Stage 25 になると ANZ は肢芽前端部では見られなくなり、軀脚部領域に局限するようになった。この ANZ での細胞死は、発生が進むと共にさらに先端部側に局限していき、Stage 28 では軀脚部と自脚部との間の部分で細胞死が見られるようになった。後肢芽では ANZ での細胞死は Stage 20 まで見られず、Stage 21 になるとわずかに細胞死がみられるようになった。ANZ での細胞死は Stage 22 になると急に前後軸・基部先端部軸方向に大きく広がった。この細胞死領域は、Stage 24 から 25 にかけて軀脚部領域に局限した。さらに Stage 26 以降は、前肢芽と同様に細胞死領域は先端部側に局限し、Stage 28 では軀脚部と自脚部との間の部分で細胞死が見られるようになった。

次に Nile Blue 法の結果を説明する。Nile Blue 法では、前肢芽の ANZ での細胞死は Stage 20 から見られた。この細胞死領域は Stage 24 までは肢芽前端部から後側・先端部側に向かって広がった。そして TUNEL 法で見られるのと同じように、Stage 25 からは軀脚部領域に局限して見られるようになった。後肢芽では Stage 22 からわずかに細胞死が見られるようになり、それが Stage 24 までに後側・先端部側に向かって広がった。この細胞死領域は Stage 24 から 25 にかけて軀脚部領域で顕著に見られるようになり、Stage 26 ではやや先端部領域に局限した。

TUNEL 法より Nile Blue 法の方が ANZ での細胞死が検出できるのが遅いのは、TUNEL

法は死細胞を検出し、Nile Blue 法はそれを食作用によって取り込む細胞を検出する手法の違いによるものだと考えられる。また、後期の発生段階においてその時間差があまり見られなくなってくるのは、後期の発生段階の方が次の発生段階に進むのに時間を要するためだと考えられる。

TUNEL 法と Nile Blue 法の細胞死領域の検出により、前肢芽の方が後肢芽よりも ANZ での細胞死が起こり始めるのが早いことが示された。さらに、前肢芽では後肢芽よりも、肢芽前端部での細胞死が起こる時期が非常に長いことが示された。

また、四肢や指の形成・指の本数決定に大きく関わっていることが示されている AER では、細胞死が起こることが報告されている。本研究の Nile Blue 法を用いた細胞死検出では、AER の細胞死の起こる時期も前肢芽と後肢芽の間で異なることが示された。AER での細胞死は Stage 18 の初期である 33 体節期から AER の前側での細胞死が起こり始め、この AER の細胞死は Stage 22 になると肢芽全体に広がり、その状態は Stage 24 まで維持されていた。Stage 25 でも大半の個体は AER 全体で細胞死が起こっていたが、細胞死が前側に限局している個体も存在した。そして Stage 26 では AER での細胞死はほとんど見られなくなった。後肢芽では Stage 18 での AER の細胞死は見られず、Stage 20 の間に AER での細胞死が起こり始めた。この AER での細胞死は、前肢芽と同様に Stage 22 までには AER 全体に広がり、その状態は Stage 24 まで維持されていた。前肢芽と同様に、Stage 25 でも大半の個体は AER 全体で細胞死が起こっていたが、細胞死が前側に限局している個体や、細胞死がほとんど起こっていない個体も存在した。そして後肢芽も、Stage 26 では AER での細胞死はほとんど見られなくなった。

以上の観察結果から、前肢芽では AER での前側の細胞死も、ANZ と同様に後肢芽より早く始まることが示された。このことから、私は前肢芽と後肢芽の AER の前側では細胞死の他に何らかの違いがあるのかもしれないと考えた。そこで、まずは前肢芽と後肢芽の AER が誘導され始める Stage 16 から AER の状態を観察し、前肢芽と後肢芽の間で比較することにした。

3. 前肢芽と後肢芽の AER の前側の挙動の違い

まずは AER が誘導されはじめる Stage 16 から、予定運命図を作成した Stage 20、さらに Stage 22 までの時期の前肢芽・後肢芽の AER を観察し、AER の前側部分に違いがあるのかどうかを比較することにした。そのために AER の前駆細胞と AER 全体で発現するこ

とが知られている *Fgf8* 遺伝子の発現を、Whole mount *in situ* hybridization 法を用いて可視化することによって AER を観察することにした。前肢芽では Stage 16 の 28 体節期から *Fgf8* の発現が始まった。この発現は前側に広がって、Stage 17 の 30 から 31 体節期までには、前肢芽の前端部の目安である 15 体節まで *Fgf8* の発現が広がった。後肢芽では Stage 17 の 29 体節期から *Fgf8* の発現が始まり、31 から 32 体節期までには、後肢芽の前端部の目安である 26 体節の途中まで *Fgf8* の発現が広がった。肢芽の前端部は Stage 19 になると認識できるようになるが、32 体節期からこの時期までは前肢芽・後肢芽ともに肢芽前端部まで *Fgf8* の発現が見られた。しかし予定運命図を作成した Stage 20 では、*Fgf8* 発現領域の前端部は、前肢芽でのみ肢芽前端部から大きく後側にずれた。Stage 20 の後肢芽では、Stage 19 と同様に、*Fgf8* 発現領域の前端部は肢芽前端部と一致していた。Stage 21 になると、後肢芽の *Fgf8* 発現領域の前端部も肢芽前端部よりやや後側にずれた。しかし前肢芽の *Fgf8* 発現領域の前端部は、後肢芽よりも肢芽前端部との距離が大きくなった。Stage 18 以降は後肢芽の方が前肢芽よりもやや発生が早いにも関わらず、Stage 22 でも *Fgf8* 発現領域の前端部と肢芽前端部との距離は、前肢芽の方が大きかった。

4. 前肢芽特異的な AER の前側の退縮

前肢芽の前側の AER は後肢芽よりも大きく後側にずれていくことが示された。私は、このずれを引き起こす原因を、大きく分けて 2 つに考えた。1 つは、前肢芽の AER の前側(前端部)の細胞が、より速く後方に移動してしまう場合である。もう 1 つは、前肢芽の AER の前側(前端部)の細胞が、AER の細胞ではなくなってしまうためにずれが引き起こされているように見える場合である。この 2 つの仮説のうちどちらが正しいのかを調べるために、私は Stage 18 の前肢芽・後肢芽の AER の前端部の細胞群を蛍光色素で標識し、後の発生段階において、標識された細胞群がどのような挙動を示すかを観察した。すると、Stage 18 で標識した前肢芽の AER の前端部の細胞は、Stage 20 において肢芽の腹側に広がって存在した。さらに *Fgf8* で可視化した AER の画像を重ね合わせると、標識された細胞は *Fgf8* 発現領域とは重ならなかった。つまりこの結果は、Stage 18 の前肢芽の AER の前端部の細胞群が、Stage 20 において AER の細胞ではなくなったことを示している。一方後肢芽では、Stage 18 で標識した AER の前端部の細胞は、Stage 24 においても肢芽の背腹軸の境界に存在していた。さらに *Fgf8* で可視化した AER の画像と重ね合わせると、標識された細胞群は、*Fgf8* 発現領域の前端部と一致した。つまり Stage 18 の後肢芽の AER の前端

部の細胞は、Stage 24 まで AER の前端部の細胞の機能を維持していたことが示された。この結果から、Stage 18 の前肢芽の AER の前端部の細胞は、Stage 20 までに AER の細胞ではなくなってしまうのに対し、Stage 18 の後肢芽の AER の前端部の細胞は、Stage 24 まで AER の前端部の細胞として存在することが示された。以後、前肢芽の AER の前側の細胞が AER の細胞でなくなってしまう現象を、「退縮」とする。

次に私は、この前肢芽特有の AER の退縮が、Stage 20 以降も続くのかどうかを調べた。そのために、Stage 20 の前肢芽・後肢芽の AER の前端部、あるいは前端部より少し後側を標識してその細胞を Stage 25 で観察した。Stage 20 の前肢芽において AER の前端部を標識したところ、標識された細胞群は Stage 25 の肢芽の先端部側に移動していた。また、この標識された細胞群は背腹境界に存在していた。しかし AER を可視化して画像を重ね合わせた結果、それらの細胞群は *Fgf8* の発現領域とは重ならなかった。また、AER の前端部より少し後側の細胞群を標識したところ、この細胞群は肢芽の先端部に移動し、*Fgf8* 発現領域の前端部と一致した。これらの結果から、前肢芽の AER の前側は、Stage 20 以降も退縮し続けることが示された。

また後肢芽でも、Stage 20 において肢芽前端部に存在する AER の前端部の細胞を標識した。すると Stage 25 になっても、これらの細胞群は AER の前端部に存在していることが示された。この後肢芽の AER の前端部の細胞は、Stage 28 では AER の前端部より基部側に残り、AER の細胞ではなくなっていた。

以上の結果から、後肢芽では、AER が肢芽前端部まで伸長する Stage 18 から、少なくとも Stage 25 までは、AER の前端部の細胞は、AER の前端部として存在し続けることが示された。一方前肢芽は、Stage 18 以降の AER の前側の細胞は、退縮を続けることが示された。このことから、前肢芽の AER の前側は退縮し続け、前肢芽の AER の前側の長さが後肢芽よりも小さくなることが予想される。

5. 前肢芽の AER の前側の退縮と指の本数決定との関係

序論で述べたように、AER 全体が存在しないと指を含めた四肢の構造は形成されない。また、AER を前側から除去していくと、除去した大きさに応じて前側から指の本数は減少していく。さらに過去の知見を見ると、各指は自脚部形成時における、AER に囲まれた間充細胞から形成されてくる。これらの知見と予定運命図の結果、前肢芽の AER の前側の退縮の結果から、前肢芽は AER の前側が退縮し、AER の前側の長さが小さくなること

によって、後肢芽の第 1 指に相当する指を形成しないようにしているのではないかと考えた。そこで AER の前端部と指形成領域との位置関係を調べるために、Stage 20 の前肢芽・後肢芽の前端部と先端中央部の間充織の細胞群を標識し、各発生段階まで発生させ観察した。その後 AER を可視化して、標識された 2 点の細胞群と AER の前端部との 3 点の位置関係を調べた。先端中央部の細胞群は、前肢芽では最前指、後肢芽では第 2 指を形成する。もし仮説が正しいければ、前肢芽の AER の前端部は発生が進むとともに後肢芽の AER よりも後側・先端部側に存在するようになり、先端中央部を標識した間充織細胞群に近づいていくはずである。AER の前端部と先端中央部に標識された間充織細胞群との距離が近いほど、この 2 点との間に指を形成することができないようになっていくと予想できる。

この実験の結果、前肢芽の AER の前端部は後肢芽の AER の前端部よりも、発生段階が進むほど先端中央部を標識した細胞群に近づいていくことが示された。前肢芽と後肢芽の AER の前端部と標識された 2 点の間充織細胞群との位置関係を比較すると、後肢芽は Stage 26 までは AER の前端部が先端中央部を標識した間充織細胞群よりも前端部を標識した間充織細胞群に近い。それに対し、前肢芽は Stage 22-24 の時点で AER の前端部が標識された 2 点の間充織細胞群の中間付近に存在していることがわかる。Stage 27 になると、後肢芽の AER の前端部は、先端中央部を標識した間充織細胞群に急に近づく。しかし前肢芽は、後肢芽よりも Stage 26, 27 の時点で AER の前端部が先端中央部を標識した細胞群に非常に近づいていた。

次に私は、Stage 25/26 において、「AER 全体の長さ」に対する「AER の前端部から先端中央部を標識した間充織細胞群までの AER の長さ」が占める割合を求めた。すると、求めた割合の平均値は、前肢芽の方が後肢芽よりも 10% 近く小さかった。

これらの結果は、仮説の通り前肢芽では AER の前側が大きく退縮することによって最前指を形成する領域より前側の AER の長さが小さくなり、最前指と AER の前端部との間に、後肢芽での第 1 指に相当する指を形成する領域がほとんどなくなっているという可能性を強く支持するものである。

Ⅲ．考察

1. 本研究から得られた鳥類の前肢の指の本数決定機構に関する考察

本研究は、前肢芽・後肢芽の予定運命図の比較解析から、前肢芽の 3 本の指を形成する領域は、後肢芽の Stage 20 の第 2, 3, 4 指を形成する領域と相対的に同じ位置にあることを示した。さらに、前肢芽では指形成領域より基部側の部分に寄与する領域が指形成領域を小さくするかのように後側に存在し、後肢芽の第 1 指を形成する領域に相当する領域が存在しないように見られることを示した。この前肢芽と後肢芽の予定運命の違いは、肢芽の前側の領域で見られた。このことから私は、前肢芽と後肢芽の指の本数の違いは、前肢芽と後肢芽の前側の予定運命の違いに起因するのではないかと考えた。そのため、前肢芽・後肢芽の前側の予定運命の違いと、それに伴う指の本数決定に関わっている可能性のある発生イベントを探索した。この結果、前肢芽では ANZ での細胞死が非常に早い時期から起こり始めることと、AER の前側が大きく退縮していくことという 2 つの現象を、鳥類前肢の指の本数決定に関わる発生イベントの候補として示した。

1 つ目の候補として示した ANZ で起こる細胞死は、前肢芽でのみ、Stage 18 から始まる。そしてこの細胞死領域は、前肢芽の前側に存在する、前肢形成に寄与しない領域とほぼ一致する。この結果は、前肢芽の前側では非常に早い時期から細胞死が起こることによって、前側のほとんどの細胞が前肢形成に寄与しないという可能性を示唆する。そしてこの現象によって、指より基部側を形成する領域が後側にずれるために、指を形成する領域が後肢芽より小さくなるという可能性を考えることができる。

2 つ目の候補として示した AER の退縮は、指の形成に必須である AER の前側が AER の細胞ではなくなっていくという現象である。この現象は前肢芽でのみ起きていた。このことから、前肢芽では AER の退縮によって、本来ならば、後肢芽の第 1 指に相当する指を形成する領域に AER が存在しなくなり、その領域で指が形成しないという可能性を考えることができる。

本研究で示した、鳥類前肢の指の本数決定機構に関わる発生イベントとして挙げられる 2 つの候補は、いずれも前肢芽・後肢芽の間で大きく予定運命が異なる前側で起きる現象である。しかしいずれの結果も、前肢芽・後肢芽の前側の予定運命の違いと、それによって引き起こされると考えられる指の本数決定との相関関係を示したにすぎない。そのため、今後は各結果について指の本数決定との関わりを詳細に検証していく必要がある。鳥類前

肢の指の本数決定に関わる発生メカニズムを解明するために、本研究で得られた結果から、予定運命、細胞死、AER などについて、指の本数決定機構とどのように関わっている可能性があるのか、新しく示されたことは何か、今後何を明らかにしなくてはならないのか、ということについて、考察していきたい。

2. 予定運命図作成から得られる新しい形態形成の変化のモデル

本研究で何度も言及してきたように、予定運命図作成の結果、前肢芽は後肢芽の第 1 指に相当する指を形成する領域が存在せず、その分指形成領域が小さいために、3 本しか指を形成しないと考えられる。しかし前肢の 3 本の指は後肢の第 2, 3, 4 指と相対的に同じ位置から形成され、予定運命の違いを生み出しているのは指を形成しない前側の領域である。

「指形成領域より基部側に寄与する領域の予定運命の変化が指形成領域を小さくし、指の本数を減少させる」というモデルは、現在ではまだ仮説の段階である。しかし現在までの研究で、本研究のように別の場所・領域の予定運命の変更が、ある構造を欠失させる、あるいは獲得させる、というモデルは存在しない。予定運命図作成の主な目的は発生メカニズムの解析の 1 つであり、ある構造の欠失や獲得に関する研究は、欠失/獲得が起きた一部分に焦点を当てた研究が多数を占める。そのため、「指とは別の領域に寄与する領域の予定運命の変更における指の欠失」を示した本研究は、形態形成学に新しいモデルを加えることになるかもしれない。

現時点では、前肢芽の予定運命を変更しているとする原因が明らかとなっていないため、今後は本研究で前肢芽・後肢芽の間の予定運命の違いを引き起こす候補として挙げた、細胞死と AER の退縮を合わせて検証することが必要である。そのために、前肢芽の細胞死を抑制する、あるいは AER を伸長させて指の本数を増加させた場合に、予定運命の変更が起こるかどうかを調べる必要がある。これらの手法を用いて、前肢芽の予定運命を後肢芽と同様の予定運命に変更させ、後肢の第 1 指に相当する指を形成させることができたとき、「前肢芽は前側の予定運命を変更して指の本数を 3 本にしている」という仮説がより強く示されるだろう。

3. 細胞死が四肢の形態形成に与える役割

四肢における細胞死の役割として最もよく知られているのは、指間部の細胞死である。自脚部が形成される際、指間部では細胞死が起こることにより指と指との間が離れていく。

もしこのとき細胞死が起こらなければ、指と指との間に水かき状の構造ができてしまう。この指間部の細胞死については、細胞死抑制実験やその原因となる遺伝子解析、水かきをもつアヒルの足ともたないニワトリの足の比較解析などから明らかとされている。そのため、指間部の細胞死には指と指との間を分ける役割があることは確実であると言える。しかし、他の細胞死領域の役割については、ANZ や AER での細胞死を含め、明らかとなっていないことが多い。

ANZ については、ニワトリの後肢芽で BMP シグナリング経路を阻害すると、ANZ での細胞死が抑制されて、軟骨をもたない間充織の突起が指より前側に形成されるという報告や、多指となるニワトリの変異体では ANZ が存在しないという報告は存在する。しかし実際に、ANZ での細胞死を直接抑制して四肢の形態に変化が見られた、という報告は存在しない。

本研究でも、ANZ の四肢形成における役割を解明することはできなかった。ただし、新たにニワトリの前肢芽と後肢芽の ANZ の違いを 2 つ示すことができた。1 つ目は、ANZ での細胞死が起こり始める時期が大きく異なることである。もう 1 つは、その細胞死が、前肢芽では前端部領域で長期間起こっていることである。TUNEL 法や Nile Blue 法の解析から、Stage 22 以降の前肢芽・後肢芽の ANZ は、肢芽の柱脚部領域で起こっていた細胞死が Stage 24/25 で軸脚部領域に局限し、それが発生の進行とともにさらに先端部に局限していくという点で同様である。このことから、前肢芽でのみ起こる Stage 18 から Stage 21 までの肢芽前端部領域から広がる細胞死が、ニワトリ、もしくは鳥類の前肢芽特異的な細胞死であるということが示される。よって細胞死が指の本数を含む前肢の形態形成に関わっているとすれば、この前肢芽特異的な細胞死が関係する候補になると考えることができるだろう。予定運命図の、前肢芽にのみ存在する前側の前肢形成に寄与しない領域と、前肢芽特異的な前側の細胞死領域がほぼ一致することは、細胞死が、前肢芽の前側の前肢形成への寄与を抑制している可能性を示唆している。

AER については、Nile Blue 法により、前肢芽・後肢芽の間の、AER での細胞死の違いを示すことができた。AER で細胞死が起こることは古くから知られていた。しかし、前肢芽と後肢芽で AER の細胞死の起こる時期が異なることや、AER の細胞死領域が局限する時期が存在し、全く起こらない時期も存在することを突き止めたことは新しい発見である。ただし、AER での細胞死の機能については、ほとんど明らかにされていない。なぜ前側で起こり始めた細胞死が全体に広がるのか、また各発生段階での AER の細胞死の状態は四

肢の形態形成にどのような役割を果たしているのか、といった問題の解明は、今後の課題となるだろう。

Nile Blue 法では、33 体節期からニワトリ前肢芽の AER での前側の細胞死が検出された。しかし TUNEL 法の方が Nile blue 法よりも ANZ での細胞死を早い発生段階から検出できたことから、Nile Blue 法では実際の細胞死より遅い時期を検出している可能性がある。前肢芽の AER は 30 から 31 体節期では予定肢芽前端部領域まで伸長していた。このため、AER の前側の細胞死は、AER が肢芽前端部領域まで伸長しきった直後から起きている可能性がある。この前肢芽の AER の前側の細胞死が、鳥類特異的な前肢芽の形態、指の本数決定に関わっているのか、その中でも後述する前肢芽特異的な AER の退縮機構に関わっているのかを今後検証していくべきだろう。Stage 18 から Stage 20 の AER の前側の細胞死は、前肢芽のみで見られる。この細胞死領域は、Stage 18 から Stage 20 における、AER の前側の退縮する部分とほぼ一致する。このことから、前肢芽の AER の前側の細胞死は、Stage 18 から Stage 20 にかけての前肢芽の AER の前側の退縮と、何か関係があるのかもしれない。

このように本研究では、前肢芽と後肢芽の ANZ と AER の前側の細胞死に着目した。過去の研究から、Stage 20 から Stage 26 までの前肢芽・後肢芽の間充織細胞の分裂する細胞の割合は、軟骨組織になる領域を除けば肢芽全体で一様であることが示されている。AER 全体の細胞分裂の状態に関しては不明であるが、局所的に分裂する細胞の割合が高い、もしくは低いといったことは報告されていない。また本研究では、前肢芽でのみ起こる早期の ANZ や AER の前側での細胞死が、それぞれ前肢形成にほとんど寄与しない領域と AER が退縮する前側の部分とほぼ一致することを示した。これらの本研究で示した細胞死と、これまでに報告された細胞分裂の状態から、細胞死は、一様に分裂する肢芽の細胞のうち、不要な細胞を除去する役割をもつことが示唆される。

4. 前肢芽特異的な AER の前側の退縮と前肢の形態形成との関係

前肢芽は Stage 20 以降、後肢芽よりも早く AER の前端部が肢芽前端部より後側にずれていくことを示した。この観察結果だけでは前肢芽と後肢芽の発生速度の差と捉えることもできる。そのため私は、前肢芽と後肢芽の AER の前側の動態に違いが存在するのかどうかを調べた。その結果、AER が肢芽前端部に伸長する Stage 18 の後肢芽では、AER の前端部の細胞は、少なくとも Stage 25 まで AER の前端部に存在し続けていた。それに対

し前肢芽では、Stage 18 から Stage 25 まで、AER の前側の細胞が AER の細胞ではなくなってしまう、退縮という現象が起こり続けていた。このニワトリの前肢芽と後肢芽の AER の動態の差は新しい発見である。この発見は、四肢の形態に大きく関係する AER がどのように鳥類特異的な前肢の形態をつくり上げているのかを調べる上で、大きな知見となるだろう。実際に本研究では、この前肢芽特異的な AER の退縮が前肢芽の指形成領域を小さくし、指の本数を減少させる可能性を示唆している。今後は、この前肢芽特異的な AER の退縮の原因となるメカニズムを解明することと、AER の退縮が本当に指の本数の減少に関わっているのかを検証することが課題となる。

この他予定運命図より、AER の退縮は、指形成領域より基部側に寄与する領域が前肢芽では後肢芽よりもかなり後側に存在したことも、関わっていると考えられる。四肢の基部先端部軸に沿った予定運命には、AER からのシグナル(FGF タンパク質)を受け取った時期などが重要とされている。前肢芽と後肢芽の基部側を形成する領域の予定運命の差も同様に、AER からのシグナルの影響を受けているのではないだろうか。前肢芽では AER の前端部が大きく後側に退縮していくことで、後肢芽よりも AER の前端部から受けとるシグナルの位置が大きく後側にずれる。この結果前肢芽では、基部側を形成する前側の予定運命も、それに従って大きく後側にずれると考えられる。

5. 細胞死と AER の関係とそれに関わる遺伝子

ここまで前肢芽と後肢芽の前側の細胞死と AER の動態について別々に考察してきたが、細胞死を引き起こす原因と AER の維持、それらに関わる遺伝子には様々な関係があることが明らかとなっている。肢芽の AER を除去すると、直下の間充織細胞で過剰な細胞死が起きて肢芽の伸長が停止する。このことから、前肢芽の前側の AER が存在しなくなることが前側の間充織細胞で細胞死が起こることと関係しており、さらに細胞死によってその部分が前肢形成に寄与しない可能性が考えられる。また、AER から間充織に向けて生存のシグナル(FGF タンパク質)が送られているだけでなく、間充織側からも AER の機能を維持する FGF10 タンパク質が分泌されている。そして間充織細胞の *Fgf10* の発現は、AER からの FGF タンパク質によって維持されるというフィードバックループが形成されている。私が観察した結果、Stage 20 では前肢芽でのみ前側で *Fgf10* の発現がほとんど見られず、この領域は ANZ での細胞死領域とほぼ一致していた。このことと ANZ での細胞死が Stage 20 より前の Stage 18 から起こることをあわせて考えると、前肢芽の前側では、早

期の ANZ での間充織細胞の細胞死によって *Fgf10* を発現する細胞が減少し、AER の細胞が受容する FGF10 タンパク質が減少するために、AER の退縮が起こる可能性も考えることができる。

この他、BMP ファミリー、特に *Bmp4* は肢芽の前側や AER に発現し、細胞死を引き起こすことや AER の維持を阻害することが報告されている。Stage 20 の前肢芽と後肢芽において *Bmp4* の発現に差は見られなかった。しかし近年、退化した小さな生殖器をもつキジ類のニワトリと、大きな生殖器をもつカモ類のアヒルの生殖器の発生を比較した研究が報告された。その研究では、同様の形態をしている生殖器の発生段階において、*Bmp4* の発現がキジ類であるニワトリでのみ見られ、その後細胞死によってニワトリの生殖器が短縮していくことが明らかとなっている。このことから、ニワトリの前肢芽と後肢芽との間でも、同様の形態をしている Stage 20 以前に *Bmp4* の発現や下流のシグナリング経路などに何らかの違いが生じ、前肢芽でのみ ANZ での細胞死や AER の退縮が引き起こされている可能性がある。

これらの間充織細胞の細胞死や AER の維持に関わる遺伝子は、鳥類前肢特異的な ANZ での細胞死や AER の退縮機構を解析する上で、原因遺伝子としてまず候補に挙がるものである。これらの遺伝子を解析ことが、鳥類の前肢芽の形態や指の本数決定の分子メカニズムを解明するために重要となるだろう。

6. 鳥類前肢の 3 本の指のアイデンティティーについて

序論で述べたように、鳥類の前肢の指のアイデンティティーについては第 2, 3, 4 指という主張と第 1, 2, 3 指という主張が対立しており、約 150 年にわたり議論の的となってきた。これら 2 つの主張の根拠について、私はそれぞれの主張に大きな特徴があると考えている。第 2, 3, 4 指説を主張する根拠は、指が形成されてくる位置を基にアイデンティティーを決定している。これに対し、第 1, 2, 3 指説は指のアイデンティティーを示す遺伝子や祖先の前肢の骨格形態、つまり位置関係ではなく実際に指のアイデンティティーを示すものを根拠に主張していると考えられる。本研究の予定運命図作成でも、結果として前肢の 3 本の指を形成する領域は第 2, 3, 4 指を形成する領域と相対的に同じ位置であることを示した。この結果は指を形成する位置に基づいて第 2, 3, 4 指説を支持しているといえるだろう。

これらの位置と遺伝子発現などのアイデンティティーとの食い違いについて、frame

shift 仮説というものが提唱された。ニワトリの後肢芽の自脚部が形成される時期に、指間部の細胞を除去、あるいは指間部から分泌される BMP シグナリングを阻害すると、指間部の前側に存在する指のアイデンティティが 1 つ前側のものになる。例えば、発生中の第 2 指と第 3 指の間の指間部を除去、あるいは BMP シグナリングを阻害すると、形成途中の第 2 指のアイデンティティが第 1 指に変更される。第 3 指と第 4 指の間の指間部で同様の操作をおこなうと、第 3 指のアイデンティティが第 2 指に変更される。そのため、鳥類の前肢芽では指を形成する際にアイデンティティが 2, 3, 4 から 1, 2, 3 に変更されるのではないかと予測されたのである。実際には発生のより初期の段階で、この frame shift が鳥類の前肢芽で起きているということを(early frame shift)、私の指導教授である田村宏治教授と私は突き止めた。

肢芽の形成過程で AER の他にもう 1 つ大きな役割を果たしているのが ZPA (Zone of Polarizing Activity)とよばれる、前後軸に沿った四肢の構造の形成・アイデンティティ決定に必須な領域である。この領域では *Shh* 遺伝子が発現しており、自脚部では第 1 指より後側の指の形成とアイデンティティ決定に大きな役割を果たしている。この *Shh* による指のアイデンティティ指定機構はマウスを用いて解明されたが、本考察ではまず、第 5 指を形成しないこと以外はマウスと同様の指のアイデンティティ指定メカニズムをもつニワトリの後肢について説明する。ニワトリの後肢芽では指のアイデンティティは Stage 21/22 に指定され、第 4 指は ZPA の子孫細胞から形成される。第 3 指、第 2 指は ZPA の領域外の細胞から形成され、SHH タンパク質の前後軸に沿った濃度勾配によってアイデンティティが指定される。第 1 指は SHH タンパク質非依存的に形成される。前肢の場合、指のアイデンティティ指定時期までに early frame shift という現象が起こり、指のアイデンティティが前側に変更される。

本研究の予定運命図作成で扱った Stage 20 の時点では、前肢芽の 3 本の指を形成する領域は後肢芽の第 2, 3, 4 指を形成する領域と相対的に同じ位置に存在する。そして前肢芽・後肢芽ともに最後指・第 4 指を形成する部分は、ZPA 内に位置している。ただしこの時期に指のアイデンティティは指定されていない。指のアイデンティティが指定される Stage 21/22 になると、後肢芽では上述したように第 4 指形成領域は ZPA 内に位置したままとなり、第 4 指として指定される。しかし前肢芽の最後指形成領域は Stage 21/22 までに ZPA の前側に位置するようになり、第 3 指として指定される。そしてそれより前側の 2 本の指は第 1 指、第 2 指として指定される。この前肢芽特異的なイベントが early frame

shift であり、後に 3 本の指の遺伝子発現が第 1, 2, 3 指として発現するようになる機構である。その後、前肢芽の 3 本の指はアイデンティティの指定、決定に従って第 1, 2, 3 指を形成する。私たちはこの early frame shift を示したことで、上述した第 2, 3, 4 指に相当する領域から第 1, 2, 3 指を形成することを示した。そして、150 年にわたる鳥類の指のアイデンティティに関する問題を解決することとなった。今後の課題は、鳥類の前肢芽はどのような発生イベント、あるいは分子メカニズムの変化によって early frame shift が起こるのかを解明することだろう。

7. 結尾

本研究で扱った鳥類前肢の指の本数決定機構において、最も重要な役割を果たしているのは AER の前側の退縮であろう。前肢芽・後肢芽の予定運命図は、指の本数の違いが Stage 20 の肢芽の前側領域の予定運命の違いによる、指形成領域の大きさの違いに起因するのではないかということを示した。しかし Stage 22 において FGF2 タンパク質を前肢芽の前側に添加すると、本来の第 1 指の前側に第 1 指に類似した過剰指を形成させ、指の本数を増加させることができる。このことから、Stage 20 の時点で指の本数は指定されているわけではなく、Stage 20 で見られた指形成領域の大きさの違いは、Stage 30 までに起きる前肢芽特有の AER の前側の退縮によって生み出されるものが反映されたものである、という可能性が本研究によって示唆される。Ⅲ-4 で記述したように、前肢芽の指形成領域を小さくしているように見られる基部形成領域の後側へのずれも、AER の前側の退縮が原因である可能性が高いと考えられる。つまり予定運命図が示した Stage 20 の前肢芽・後肢芽の前側領域の予定運命の大きな違いと、それによって引き起こされると見られる指形成領域の大きさの違いの実態は、前肢芽の AER の前側の大きな退縮に伴う前側間充織の指定あるいは決定のずれと、同じく AER の前側の大きな退縮に伴って自脚部形成時までに規定される実際の指形成領域の大きさの違いが反映されたものであったのだと考えられる。

そして、本研究で最初に着目した前肢芽特有の肢芽前端部から広がる ANZ での細胞死は、AER の退縮によって AER の前側が存在しなくなることで引き起こされた可能性がある。また、AER の退縮より前から ANZ での細胞死が起きていたことを考慮すると、細胞死によって *Fgf10* 発現細胞が減少し、AER の前側の退縮が起きている可能性も考えられる。前肢芽の AER の前側の細胞死が AER の退縮より早く起こり始めることも、AER の前側の退縮を引き起こす役割を担っている可能性がある。

しかし本研究ではこれらの可能性を示したにすぎず、前肢芽の指の本数決定機構を解明することはできなかった。これらの可能性を検証し、実際にどのようにして鳥類前肢の指の本数が決定されているのかを解明していくことが、今後の課題となる。この他、本研究の大きな問題として挙げられるのは、ニワトリの前肢芽と後肢芽のみを比較したという点である。本研究の結果は、四足動物全体の前肢芽・後肢芽の発生メカニズムの違いを示している可能性がある。また、鳥類の後肢の構造は、軀脚部の後側の骨(腓骨)が非常に小さいなど、他の四足動物と比較して特殊化している部分が多く存在する。本研究で示したニワトリ前肢の発生メカニズムが、鳥類の前肢特有の発生メカニズムであるのか、四足動物全体の前肢の発生メカニズムの特徴であるのかを明らかにする必要がある。そのために、鳥類以外の四足動物の前肢芽と後肢芽の発生において、鳥類前肢と同様の現象が起きていないのかどうかを検証しなければならない。

本研究では、鳥類前肢の指は、AERの前側の退縮によって後肢の第1指に相当する指を形成せず、第2, 3, 4指を形成する領域に相当する領域から3本の指を形成することを示した。さらにⅢ-6で、3本の指は、early frame shiftによって第1, 2, 3指として形成されることが示されている。これら2つの研究成果は、鳥類前肢の指の発生メカニズムの一端を解明したことによって、鳥類前肢の発生の解明に大きく貢献することができるだろう。それと同時にこの研究成果は、鳥類の前肢は、指だけでも他の四足動物と比較して非常に特殊な発生イベントを経て形成することを示している。翼がどのようにして形成されるのかを解明するためには、今後も非常に多くの研究が必要となるだろう。しかし現在では、ニワトリの四肢の各指で発現する遺伝子の網羅的解析や、様々な鳥類のゲノムの解読など、鳥類に関する研究は以前にも増して盛んに行われるようになってきている。これらの研究がさらに進めば、翼の形態形成が解明される日が来るのもそう遠くはないのかもしれない。そしてこの翼の形態形成の解明は、発生生物学だけでなく、進化学・古生物学的にも大きな意義があるはずである。それは例えば、前肢に第1, 2, 3指の3本の指という共有派生形質をもつ鳥類の祖先、またはそれに近いとされる始祖鳥や獣脚類恐竜も、現存する鳥類と同様の指の本数決定機構を用いて前肢の指の本数を3本にしていたらろうし、early frame shiftを起こして第1, 2, 3指を形成していたと考えられるからだ。この発生生物学的知見と進化学・古生物学的知見との融合は、鳥類の翼の発生・進化についての研究を飛躍的に進歩させることになるだろう。

翼とは、様々な点で私たち人に非常に大きな影響を与えてきたものの1つである。翼を

もった鳥がいなければ、絶滅してしまった恐竜を含めた四足動物の四肢の発生や進化の研究は、ここまで進まなかったであろう。また、人は空を飛ぼうと考えなかったかもしれない。私たち人は翼に魅せられ、憧れて翼を解明しよう、翼に近づこうとしてきたはずである。少なくとも私はそう感じてきたし、だからこそ本研究のテーマを設定し取り組んできたのである。本研究が翼という神秘の解明の一助となることを願っている。